

令和元年5月28日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221105

研究課題名(和文) 翻訳後修飾ペプチドを介した植物形態形成の分子機構

研究課題名(英文) Molecular dissection of plant development and cell-to-cell signaling mediated by posttranslationally modified peptides

研究代表者

松林 嘉克 (Matsubayashi, Yoshikatsu)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：00313974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 170,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物成長を制御する新しい細胞間シグナルとして注目の集まる翻訳後修飾ペプチドホルモンの探索や受容機構などの解明を行なった。局所的な窒素欠乏を他の根に伝えるペプチドホルモンCEPおよびその受容体CEPRの発見、植物の根の拡散障壁であるカスパリー線の形成に必要なペプチドホルモンCIFの発見、根端分裂組織の細胞分裂活性を制御するRGFの受容体RGFRの同定などの成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然界における植物は決して最適ではない環境で生き抜くため、種々の巧妙なしくみを進化させてきた。空間的に不均一な窒素栄養環境下で窒素を効率よく吸収するしくみや、不要な土壤中イオンを流入させないしくみ、根の幹細胞が安定して細胞を供給する分子メカニズムの解明などは、植物成長の根幹の理解につながる成果である。これらの知見は変化する環境に耐える頑強な植物の作出を可能にし、持続可能な食料生産システムの構築に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Our goal in this project is to uncover the mechanisms by which plant development is regulated through identification of novel peptide hormones and their specific receptors. In plants, small post-translationally modified peptides constitute the largest group of peptide hormones. We explored this type of peptide hormone by in silico gene screening coupled with biochemical and functional analysis, which led to the identification of two types of novel peptide hormones such as CEP family peptides regulating long-distance nitrogen demand signaling and CIF family peptides required for contiguous Casparian strip formation in roots. We also identified receptors for RGF family peptides involved in root meristem development.

研究分野：生物学・植物分子生理学

キーワード：シロイヌナズナ ペプチドホルモン 受容体キナーゼ 形態形成 環境応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナゲノムに見出される 35,176 個の全 ORF から、鎖長 50-150 アミノ酸で細胞外分泌シグナル配列を持つペプチドをコードするものを探すと、1,086 個の ORF がヒットする。国内外で、この中から新しいペプチドホルモンを探索する試みが行なわれているが、機能が解明されたのはまだわずかである。単独遺伝子の破壊だけで明確な表現型の表われるものは調べ尽くされ、新たなアイデアや技術の投入なくしては新しい分子の同定は難しい状況になっている。また、既に同定された分子群についても、受容体および細胞内情報伝達機構の解明に向けて、国際的な競争が繰り広げられている。

分泌型ペプチドを構造的な特徴から分類すると、大きく 2 種類に分けられる。ひとつは全長が 10 アミノ酸程度で何らかの翻訳後修飾を伴った短鎖翻訳後修飾ペプチドであり、もうひとつは多数の Cys 残基を介して分子内ジスルフィド結合により安定化された構造を持つシステインリッチペプチドである。

植物においてこれまでに見出された分泌型ペプチドホルモンの過半数は、前者の短鎖翻訳後修飾ペプチドである。申請者は植物で最初の分泌型短鎖翻訳後修飾ペプチドホルモンである PSK の発見以来、このカテゴリーに属するペプチドに関連する分野で研究を行ない、根端メリステム活性を制御する RGF など新しいペプチドホルモン群の発見、ペプチドホルモンを認識する受容体の同定や直接的リガンド結合の証明、新しい翻訳後修飾であるヒドロキシプロリンへのアラビノース糖鎖付加の発見やチロシン硫酸化酵素の同定などの成果を挙げた。

2. 研究の目的

本研究は、以下の 3 つの中心的課題の研究を基軸として、植物ペプチドホルモンの分野をさらに発展させることを目指した。

(1) 新しい短鎖翻訳後修飾ペプチドホルモンの探索。短鎖翻訳後修飾ペプチドホルモンは、前駆体ペプチドの一部が切り出されて活性型となって細胞外に分泌される。このタイプのペプチドホルモンの前駆体ペプチドには、いくつかの構造的な特徴が見られることから、これを指標に、シロイヌナズナにおいて新規ペプチドホルモン候補群をスクリーニングし、それらの機能解析を進める。また、翻訳後修飾酵素の欠損株では、当該酵素の基質となっているすべてのペプチドの修飾が行なわれなくなるため、その表現型を手がかりに、これまで見過ごされてきた新しいペプチドシグナル群の探索を行なう。

(2) ペプチドホルモン群の受容体および情報伝達機構の解析。根端メリステム形成を制御する RGF など、受容体未知のペプチドシグナル群について、受容体の同定や下流情報伝達機構の解析を進める。また、機能不明ながら既に成熟型構造が明らかになっているペプチド群についても、直接的結合を指標として受容体を同定し、その欠損株の表現型から機能を明らかにしていく。

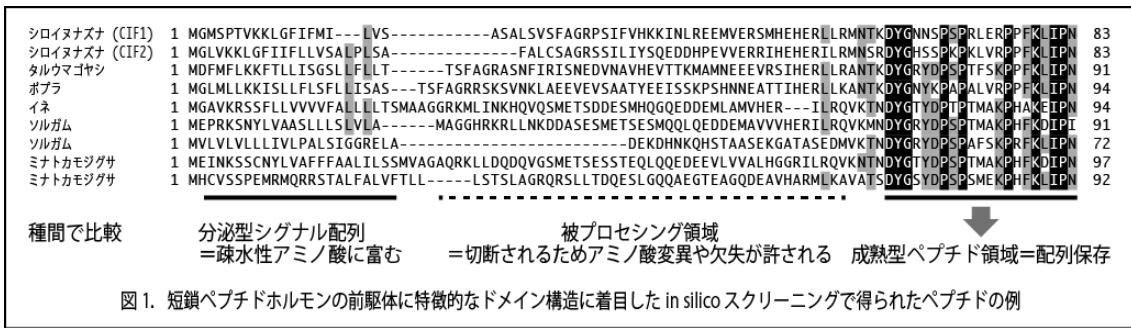
(3) ペプチドホルモンの翻訳後修飾酵素の解明。ヒドロキシプロリン残基へのアラビノース糖鎖修飾について、これに関わる翻訳後修飾酵素を明らかにする。

なお、当初の申請書では、ペプチドホルモンのプロセシング酵素の同定や細胞外動態の解析も計画に含めていたが、前者には動物のプロセシング酵素のホモログ群が関わることが次第に明らかになり新規性の観点で魅力に乏しいこと、後者では研究の過程でペプチドホルモンの一部には道管を通して根から葉へ移行するものもあることが明らかになり、全体を一般化して研究する必要がなくなったことから優先順位を下げ、上記 3 項目に注力することとした。

3. 研究の方法

(1) 新しい短鎖翻訳後修飾ペプチドホルモンの探索

短鎖翻訳後修飾型ペプチドは約 100 アミノ酸の前駆体ポリペプチドの C 末端付近から翻訳後修飾を経て切り出され分泌される。この場合、前駆体が分子進化の過程でドメインごとに異なる選択圧を受けたことに起因する特徴的な配列保存性を示すことに着目する。すなわち、分子進化の選択圧がかかる成熟型ペプチド部分は高度に配列保存され、機能に関係しない部分には多くのアミノ酸置換や欠失が蓄積する。この規則性は、多数の植物種における配列を比較すると検出できる(図 1)。申請者らは機能未知ながらこうしたペプチドシグナル候補を数種類見出し、個々の機能解析を進めていく。また、チロシン硫酸化酵素などの翻訳後修飾酵素の欠損株では、当該酵素の基質となっているすべてのペプチドの修飾が行なわれなくなるため、その表現型を手がかりに、上記ペプチドシグナル群の機能探索を行なう。



(2) ペプチドホルモン群の受容体および情報伝達機構の解析

細胞外領域が 400 アミノ酸以上 (リガンド認識に十分なサイズ) のシロイヌナズナ受容体キナーゼ約 200 種類をタバコ BY-2 細胞を用いて発現させ、膜画分を回収してライブラリー化する。根端メリステム形成を制御する RGF など、受容体未知のペプチドシグナル群や、機能不明ながら既に成熟型構造が明らかになっているペプチド群について、光反応性の誘導体を合成し、受容体ライブラリーに対する直接的結合を指標として受容体を同定していく。一般的に、受容体側の遺伝子重複はリガンド側より少ないことが多いので、リガンド側の欠損株が作製できない場合でも受容体側の欠損株の表現型が見られれば、リガンドの機能解明に大きなヒントを与える。受容体が解明されれば、免疫沈降やトランスクリプトームなどで、下流情報伝達機構を明らかにしていく。

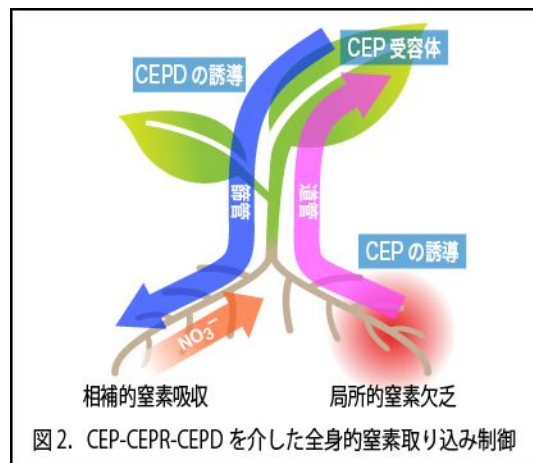
(3) ペプチドホルモンの翻訳後修飾酵素の解明

ヒドロキシプロリン残基へのアラビノース糖鎖転位酵素を、基質ペプチドを固定化したアフィニティークロマトグラフィーで精製する。チロシン残基への硫酸基転移酵素の精製で培った手法を応用して、植物特有の修飾酵素の同定を目指す。

4. 研究成果

(1) 全身的な窒素吸収制御に関わる長距離移行ペプチド CEP とその受容体 CEPR の発見

植物は地中から窒素を主に硝酸イオンとして吸収しているが、自然界での硝酸イオンの地中分布は不均一である。そのため、植物は根の一部が局所的な窒素欠乏になった時に、その情報を他の根に伝え、相補的に硝酸イオン取り込みを促進させるしくみを持っている。しかし、systemic N-demand signaling と呼ばれるこの巧妙なしくみの分子メカニズムは解明されていなかった。我々は、様々な構造的特徴を指標に、シロイヌナズナにおいて複数の新規短鎖翻訳後修飾ペプチドシグナル候補群を見出していた。そのひとつである CEP (C-terminally encoded peptide) ファミリーについて、本研究で確立した受容体発現ライブラリーを用いて直接結合を指標に受容体を探索した結果、CEP 受容体 (CEPR) が見出され、この受容体を欠損させると systemic N-demand signaling が失われることを明らかにした。すなわち、根の一部が局所的な窒素欠乏を感知すると分泌型ペプチド CEP が生産され、道管を移行して地上部の受容体 CEPR に認識される。受容体が活性化されるとその下流で未知の 2 次シグナル (後に CEPD を同定、下記参照) がつくられ、師管を介して根に移行し、離れた根での硝酸イオン取り込みを促進して、窒素不足を補填している (図 2)。この発見は、変動する環境に対する植物の巧みな適応能力の一端を分子レベルで明らかにしたものとして Science 誌に掲載され、当該号の PERSPECTIVE に解説記事が掲載されるとともに、Science Signaling 誌の EDITORS' CHOICE で紹介された。



(2) CEP 受容体下流で葉から根へ長距離移行するペプチドシグナル CEPD の発見

ペプチドホルモン CEP は、窒素欠乏時に根で誘導され、道管を通して葉の師部側にある受容体 CEPR に認識されるが、その下流で師管内を根へ移行するポリペプチド CEPD1 および CEPD2 を、葉の維管束特異的なトランスクリプトーム解析で見出した。CEPD1 および CEPD2 は、葉の師部のみで CEP 依存的に発現誘導されるが、GFP-CEPD1 を用いて解析すると、葉から根へ長距離移行することが確かめられた (図 2)。興味深いことに CEPD は葉からすべての根に移行するが、窒素十分な根のみが応答し硝酸イオン取り込み輸送体の発現を上昇させた。すなわち植物は特定の根に選択的に情報を送ることはせず、シグナルを受け取った根の判断に任せると

いう方式で情報伝達の方向性を制御していることが明らかとなった。この成果は、長年の謎だった全体的な室素要求シグナリングの基本的なメカニズムが明らかになったものとして、Nature Plants 誌に掲載され、当該号の News and Views で紹介された。

(3) カスパリー線の形成に必要なペプチドホルモン CIF の発見

配列上の特徴を指標に、新規短鎖翻訳後修飾ペプチドシグナル候補として見出していた 21 アミノ酸硫酸化ペプチドの受容体を、受容体発現ライブラリーに対する網羅的結合解析によって探索したところ、内皮細胞で発現し根の拡散障壁であるカスパリー線の形成に必要であることが知られていた受容体 GSO1/SGN3 に結合することが明らかとなった。そこで、このペプチドの欠損株を観察したところ、受容体欠損株と同様にカスパリー線が不連続化していたが、ペプチド処理によって 6 時間で再び連続化することが確かめられた(図 3)。Casparian strip Integrity Factor (CIF) と命名したこのペプチドは根の中心柱で発現し、CIF を欠損する植物は、根のカスパリー線に穴があき、濃度依存的に外界からイオンが道管に流入または道管から流出するため、至適栄養濃度以外では成長が阻害されることが明らかとなった。この発見は、植物のイオン恒常性を保つ仕組みの理解に貢献するとして評価され、Science 誌に掲載され、当該号の This Week in Science で紹介された。

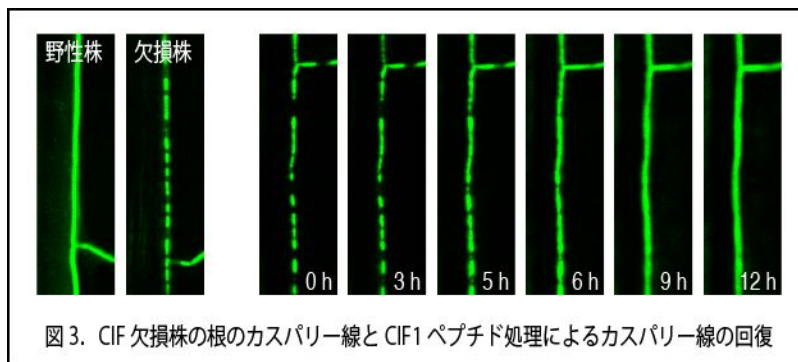


図 3. CIF 欠損株の根のカスパリー線と CIF1 ペプチド処理によるカスパリー線の回復

(4) ヒドロキシシプロリン・アラビノシル化酵素 HPAT の同定

ヒドロキシシプロリン (Hyp) のアラビノシル化は、細胞壁中に含まれる糖タンパク質や一部のペプチドシグナルに見出される植物特異的な糖鎖付加修飾である。しかし、Hyp にアラビノースを付加する酵素、Hyp *O*-arabinosyltransferase (HPAT) は、未だ同定されていなかった。我々は、シロイヌナズナ培養細胞の膜画分から HPAT をアフィニティー精製し、ゴルジ体に存在する膜タンパク質であることを突き止めた。シロイヌナズナに 3 種類ある HPAT 遺伝子を破壊すると、胚軸の徒長、細胞壁厚の顕著な減少、花成の促進、葉の老化の促進、および花粉管伸長の異常などが観察された。この成果は Nature Chem. Biol. 誌に掲載され、表紙を飾った。

(5) 根端メリステム形成を制御する RGF の受容体の同定

RGF 遺伝子は根端の静止中心およびコルメラ幹細胞で特異的に発現し、分泌された RGF ペプチドが細胞間を拡散して濃度勾配を形成することにより、下流の転写因子である PLT の発現パターンを規定して根端メリステムのパターン形成が行なわれる。この RGF ペプチドの受容体を見つけるために、シロイヌナズナ受容体キナーゼ発現ライブラリーを用いた網羅的結合解析を行ない、RGF と直接結合する 3 種類の受容体キナーゼ RGFR を見つけ出した。3 種類すべての RGFR を欠損した植物体では、RGF に非感受性になるとともに、PLT の濃度勾配が失われ、根端メリステムの細胞分裂領域が縮小して根が短くなった (PNAS 2016)。

(6) マメ科植物の根粒数制御に関与する CLE ペプチドの構造解明

マメ科植物は根粒菌と共生して根粒を形成することにより空中窒素固定を行なっているが、根粒の数は厳密に調節されている。この調節に関わる遺伝子として CLE-RS 遺伝子が同定されていたが、成熟型構造が分かっていなかった。我々は、活性型 CLE-RS2 ペプチドは 13 アミノ酸からなるアラビノシル化されたグリコペプチドであることを明らかにし、受容体と考えられていた HAR1 に直接結合することも証明した (Nature Commun. 2013)。

(7) アラビノシル化ペプチドの化学合成

1,2-*cis* 型グリコシドの合成に有効な立体特異的反応である Intramolecular aglycon delivery 法を応用して、アラビノシル化糖鎖修飾を受けたペプチドシグナル群の化学合成経路を確立した。天然からはごく微量しか得られない CLV3 や CLE-RS などのアラビノシル化ペプチドの生理機能解析が可能になった。

(8) CLV3 が直接結合する受容体群の同定

受容体キナーゼ発現ライブラリーを用いて、茎頂メリステム形成に関わるペプチドホルモンである CLV3 がダイレクトに結合する受容体群の解析を行なった。その結果、従来から知られている CLV1 に加えそのホモログである BAM1 に結合したが、もうひとつの受容体として CLV3

シグナリングに関与すると考えられていた CLV2 には結合しないことが明らかとなった。これらの結果から, CLV1 と BAM1 が真の CLV3 受容体であり, CLV2 は間接的に CLV3 シグナリングに関与する co-receptor である可能性が示された。

以上のように, 本研究では CEP や CIF など 2 種類の新しい短鎖翻訳後修飾ペプチドホルモンの発見, CEPR や RGFR などペプチドホルモン群の受容体の新規同定, 受容体下流情報伝達因子 CEPD の発見, 翻訳後修飾酵素 HPAT の同定を達成しており, 研究目的の 3 項目のすべてに大きな成果を得た。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

- (1) Ohkubo Y., Tanaka M., Tabata R., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y.
Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition.
Nature Plants 3, 17029 (2017)
doi: 10.1038/nplants.2017.29.
- (2) Cryptic bioactivity capacitated by synthetic hybrid plant peptides.
Hirakawa Y, Shinohara H, Welke K, Irle S, Matsubayashi Y., Torii KU, Uchida N.
Nature Commun. 8, 14318 (2017)
doi: 10.1038/ncomms14318.
- (3) Nakayama T., Shinohara H., Tanaka M., Baba K., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y.
A peptide hormone required for Casparian strip diffusion-barrier formation in *Arabidopsis* roots.
Science 355, 284-286 (2017)
doi: 10.1126/science.aai9057.
- (4) Shinohara H., Mori A., Yasue N., Sumida K., Matsubayashi Y.
Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113, 3897-3902 (2016)
doi: 10.1073/pnas.1522639113.
- (5) Shinohara H., Matsubayashi Y.
Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view.
Plant J. 82, 328-336 (2015)
doi: 10.1111/tbj.12817.
- (6) Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y.
Identification of three potent hydroxyproline *O*-galactosyltransferases in *Arabidopsis*.
Plant J. 81, 736-746 (2015)
doi: 10.1111/tbj.12764.
- (7) Okamoto S, Suzuki T, Kawaguchi M, Higashiyama T, Matsubayashi Y.
A comprehensive strategy for identifying long-distance mobile peptides in xylem sap.
Plant J. 84, 611-620 (2015)
doi: 10.1111/tbj.13015.
- (8) Xu C, Liberatore KL, MacAlister CA, Huang Z, Chu YH, Jiang K, Brooks C, Ogawa-Ohnishi M, Xiong G, Pauly M, Van Eck J, Matsubayashi Y., van der Knaap E, Lippman ZB.
A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato.
Nature Genet. 47, 784-792 (2015)
doi: 10.1038/ng.3309.
- (9) Wu T, Kamiya T, Yumoto H, Sotta N, Katsushi Y, Shigenobu S, Matsubayashi Y., Fujiwara T.
An *Arabidopsis thaliana* copper-sensitive mutant suggests a role of phyto-sulfokine in ethylene production.
J Exp Bot. 66, 3657-3667 (2015)
doi: 10.1093/jxb/erv105.
- (10) Tabata R., Sumida K., Yoshii T., Ohyama K., Shinohara H., Matsubayashi Y.
Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling.
Science 346, 343-346 (2014)
doi: 10.1126/science.1257800.
- (11) Matsubayashi Y.
Posttranslationally modified small-peptide signals in plants.
Annu Rev Plant Biol. 65, 385-413 (2014)
doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120122.
- (12) Bidadi H, Matsuoka K, Sage-Ono K, Fukushima J, Pitaksaringkarn W, Asahina M, Yamaguchi S, Sawa S, Fukuda H, Matsubayashi Y., Ono M, Satoh S.
CLE6 expression recovers gibberellin deficiency to promote shoot growth in *Arabidopsis*.
Plant J. 78, 241-252 (2014)

doi: 10.1111/tpj.12475.

- (13) Ogawa-Ohnishi M., Matsushita W., Matsubayashi Y.
Identification of three hydroxyproline *O*-arabinosyltransferases in *Arabidopsis thaliana*.
Nature Chem. Biol. 9, 726-730 (2013)
doi: 10.1038/nchembio.1351.
- (14) Okamoto S., Shinohara H., Mori T., Matsubayashi Y.*, Kawaguchi M.* (co-corresponding authors)
Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase.
Nature Commun. 4, 2191 (2013)
doi: 10.1038/ncomms3191.
- (15) Endo S, Shinohara H, Matsubayashi Y., Fukuda H.
A novel pollen-pistil interaction conferring high-temperature tolerance during reproduction via CLE45 signaling.
Curr Biol. 23, 1670-1676 (2013)
doi: 10.1016/j.cub.2013.06.060.
- (16) Shinohara H., Matsubayashi Y.
Chemical synthesis of *Arabidopsis* CLV3 glycopeptide reveals the impact of hydroxyproline arabinosylation on peptide conformation and activity.
Plant Cell Physiol. 54, 369-74 (2013)
doi: 10.1093/pcp/pcs174.

〔学会発表〕(計10件)

国際学会の招待講演のみ記載

- (1) Matsubayashi Y. Root-to-shoot and shoot-to-root long-distance mobile peptides mediate systemic regulation of nitrogen acquisition. Keystone Symposia, Plant Signaling: Molecular Pathways and Network Integration. Tahoe City, California USA (2018)
- (2) Matsubayashi Y. Identification of novel peptide hormones in plants. The 22nd International Plant Growth Substances Association (IPGSA) conference. Toronto, Canada (2016)
- (3) Matsubayashi Y. Identification of novel peptide ligand-receptor pairs in plants. The 27th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR). Gyeong Ju, Korea (2016)
- (4) Matsubayashi Y. Root-to-shoot mobile peptides mediate systemic nitrogen-demand signaling. Plant Biology 2016. Austin, USA (2016)
- (5) Matsubayashi Y. Long-distance mobile peptides mediate systemic nitrogen-demand signaling. EMBO conference 'The nitrogen nutrition of plants - Nitrogen2016'. Montpellier, France (2016)
- (6) Matsubayashi Y. Long-distance mobile peptides mediate systemic nitrogen-demand signaling. The 4th European Workshop on Peptide Signalling in Plants. Bischoffsheim, France (2016)
- (7) Matsubayashi Y. Identification of novel peptide ligand-receptor pairs in plants. Cold Spring Harbor Asia conference on Latest Advances in Plant Development & Environmental Responses. Awaji, Japan (2016)
- (8) Matsubayashi Y. Toward the identification of peptide ligand-receptor pairs in plants. The 38th Naito Conference – Molecule-based biological systems. Sapporo, Japan (2014)
- (9) Matsubayashi Y. Toward the identification of peptide ligand-receptor pairs in plants. 2nd European Workshop on Peptide Signaling in Plants. Regensburg, Germany (2014)
- (10) Matsubayashi Y. Toward the identification of novel peptide signals in plants. Keystone Symposia: Plant Signaling – Dynamic Properties. Colorado, USA (2014)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 細胞間シグナル研究グループ ホームページ
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~b2/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし
- (2) 連携研究者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。